

05.10.2004

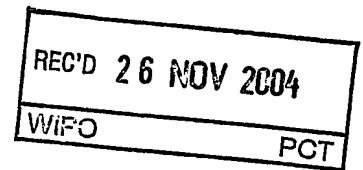
日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 0 月 1 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 3 4 3 2 1 1
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 3 - 3 4 3 2 1 1]



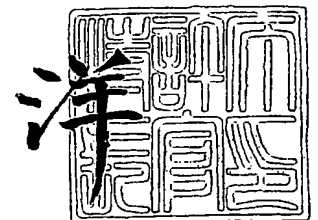
出 願 人 明 治 乳 業 株 式 会 社
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 1 月 1 1 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 P04461510
【あて先】 特許庁長官 殿
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社食品開発研究所
 内
 【氏名】 古市 圭介
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社食品機能研究所
 内
 【氏名】 依田 伸生
【特許出願人】
 【識別番号】 000006138
 【氏名又は名称】 明治乳業株式会社
【代理人】
 【識別番号】 110000084
 【氏名又は名称】 特許業務法人アルガ特許事務所
 【代表者】 中嶋 俊夫
【選任した代理人】
 【識別番号】 100068700
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 有賀 三幸
【選任した代理人】
 【識別番号】 100077562
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 高野 登志雄
【選任した代理人】
 【識別番号】 100096736
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 中嶋 俊夫
【選任した代理人】
 【識別番号】 100089048
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 浅野 康隆
【選任した代理人】
 【識別番号】 100101317
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 的場 ひろみ
【選任した代理人】
 【識別番号】 100117156
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 村田 正樹
【選任した代理人】
 【識別番号】 100111028
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 山本 博人
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 164232
 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】	特許請求の範囲	1
【物件名】	明細書	1
【物件名】	図面	1
【物件名】	要約書	1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

プロピオン酸菌に属する 1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸生産菌を乳糖含有培地中嫌氣的条件下で培養を開始し、培地中の乳糖濃度が 3.5 質量%以下になった時点で培地にエアレーションして培養することを特徴とする 1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸の製造法。

【請求項 2】

培地が、乳糖 4～8 質量%を含有する培地である請求項 1 記載の製造法。

【請求項 3】

培地が脱脂粉乳培地である請求項 2 記載の製造法。

【請求項 4】

嫌氣的条件が、窒素ガス又は炭酸ガス雰囲気下の条件である請求項 1～3 のいずれか 1 項記載の製造法。

【請求項 5】

プロピオン酸菌に属する 1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸生産菌を乳糖含有培地中嫌氣的条件下で培養し、得られた培養物に乳糖を添加し、弱アルカリ下で 3～20℃に保存することを特徴とする 1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸の製造法。

【請求項 6】

培養物への乳糖添加量が、培養物中の乳糖濃度が 0.2～3 質量%となる量である請求項 5 記載の製造法。

【請求項 7】

保存が、培養物の pH を 7～9 とし、3～20℃で 1 週間～3 週間保存するものである請求項 5 又は 6 記載の製造法。

【請求項 8】

プロピオン酸菌に属する 1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸生産菌を乳糖含有培地中嫌氣的条件下で培養を開始し、培地中の乳糖濃度が 3.5 質量%以下になった時点で培地にエアレーションして培養し、得られた培養物に乳糖を添加し、弱アルカリ条件下で 3～20℃に保存することを特徴とする 1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸の製造法。

【請求項 9】

培地が、乳糖 4～8 質量%を含有する培地である請求項 8 記載の製造法。

【請求項 10】

培地が脱脂粉乳培地である請求項 9 記載の製造法。

【請求項 11】

嫌氣的条件が、窒素ガス又は炭酸ガス雰囲気下の条件である請求項 8～10 のいずれか 1 項記載の製造法。

【請求項 12】

培養物への乳糖添加量が、培養物中の乳糖濃度が 0.2～3 質量%となる量である請求項 8～11 のいずれか 1 項記載の製造法。

【請求項 13】

保存が、培養物の pH を 7～9 とし、3～20℃で 1 週間～3 週間保存するものである請求項 8～11 のいずれか 1 項記載の製造法。

【請求項 14】

請求項 1～13 のいずれか 1 項記載の製造法により得られた 1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸含有組成物。

【書類名】明細書

【発明の名称】1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸の製造法

【技術分野】

【0001】

本発明は、プロピオン酸菌発酵を用いた1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸（以下DHNAともいう）の高濃度製造法とその培養物の風味改善技術に関する。

【背景技術】

【0002】

DHNAは、従来、染料、顔料及び感光材料として工業材料として有用であることが知られており、これまでも有機化学合成法により種々の合成法が開発されている。本発明者らは、これらに変わるDHNAの製造法について検討した結果、プロピオン酸菌により菌体内外に大量に産生されることを見い出すと共に、この培養物から採取したDHNA含有組成物、又は1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸もしくはその塩には、乳糖不耐症の牛乳の摂取時にみられる腹部不快症状を低減する作用を有すること、代謝性骨疾患の予防治療に有用であることを見出した（特許文献1）。本法により、DHNAを飲食品や医薬品に用いることを可能にしたが、DHNA含有組成物は、風味の点で必ずしも満足のゆくものではなく、商品に多用することが困難であった。

【特許文献1】国際公開第WO03/016544号パンフレット

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

本発明の目的はプロピオン酸菌発酵による風味の改善されたDHNA含有組成物の効率的な製造方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明者は、苦みの抑制されたDHNA含有組成物を得るために各方面から鋭意検討した結果、全く意外にも、プロピオン酸菌発酵中の一定の時期に培地のエアレーションを行うことで、培養物中のDHNA濃度が高まるという有用な新知見を得た。また、培養後の培養物に乳糖を添加し、弱アルカリ条件下低温保存することによっても、培養が終了しているにもかかわらず、DHNA濃度が高まることを見出した。さらに、かくして得られたDHNA含有組成物は苦みが抑制され、風味が良好であり飲食品や医薬品として有用であることを見出した。

【0005】

すなわち、本発明は、プロピオン酸菌に属する1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸生産菌を乳糖含有培地中嫌氣的条件下で培養を開始し、培地中の乳糖濃度が3.5質量%以下になった時点で培地にエアレーションして培養することを特徴とする1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸の製造法を提供するものである。

また本発明は、プロピオン酸菌に属する1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸生産菌を乳糖含有培地中嫌氣的条件下で培養し、得られた培養物に乳糖を添加し、弱アルカリ下で3～20℃に保存することを特徴とする1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸の製造法を提供するものである。

さらに本発明は、プロピオン酸菌に属する1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸生産菌を乳糖含有培地中嫌氣的条件下で培養を開始し、培地中の乳糖濃度が3.5質量%以下になった時点で培地にエアレーションして培養し、得られた培養物に乳糖を添加し、弱アルカリ条件下で3～20℃に保存することを特徴とする1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸の製造法を提供するものである。

さらにまた、本発明は前記の如くして得られた1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸含有組成物を提供するものである。

【発明の効果】

【0006】

本発明によれば、DHNAが効率良く生産でき、かつ得られたDHNA含有組成物は風味が良好で飲食品、医薬品として有用である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0007】

本発明の製造法に用いられるプロピオン酸菌としては、DHNA産生菌であれば特に限定されないが、プロピオニバクテリウム属に属する菌が好ましく、例えばプロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ(*Propionibacterium freudenreichii*)、プロピオニバクテリウム・トエニー(*P. thoenii*)、プロピオニバクテリウム・アシディプロピオニシ(*P. acidipropionici*)、プロピオニバクテリウム・ジェンセニー(*P. jensenii*)などのチーズ用の菌、プロピオニバクテリウム・アビダム(*P. avidum*)、プロピオニバクテリウム・アクネス(*P. acnes*)、プロピオニバクテリウム・リンホフィラム(*P. lymphophilum*)、プロピオニバクテリウム・グラニューロサム(*P. granulosa*)などを挙げることができる。このうち、プロピオニバクテリウム・フロイデンライヒが好ましく、さらに*P. freudenreichii* IF0 12424及び*P. freudenreichii* ATCC 6207、*P. freudenreichii* ET-3(FERM P-18454)が特に好ましい。

【0008】

本発明方法に用いる培地は、DHNAの生産性の点から乳糖含有培地が好ましい。培養開始前の培地中の乳糖含有量は4～8質量%、さらに4～7質量%、特に4～6.7質量%が好ましい。このような乳糖含有培地としては、ホエイ粉、カゼイン、脱脂粉乳、或いはホエイを透析処理して乳糖含量を減らしたホエイ蛋白質濃縮物、或いは乳糖含量を更に高純度に分離したホエイ蛋白質分離物が挙げられる。これらはそのまま、或いはプロテアーゼ処理して用いることも可能であり、酵母エキス、トリプチケース等のペプトンと、ブドウ糖、乳糖、乳糖のラクターゼ処理物等、プロピオン酸菌が資化する炭素源となり得る単糖類及び／又は2糖類等の、適量の糖類と乳清ミネラル等のミネラル分、必要に応じて牡蠣、生姜等ミネラル分を多く含む動植物性食品又はその抽出物を添加することにより培地を調製することができるが、本発明においては、乳糖を4～8質量%含有する脱脂粉乳培地を使用することが好ましい。以下に、培地原料に脱脂粉乳のプロテアーゼ処理物を主成分とする培地調製法の一例を示す。

【0009】

脱脂粉乳を10～20質量%になるように水で溶解し、温度を47℃に調整する。これにプロテアーゼを脱脂粉乳量の2.5質量%を添加し、脱脂粉乳溶液中のタンパク質を分解する。プロテアーゼとしては、動植物由来又は細菌由来のタンパク質分解酵素が挙げられ、酸性、中性、アルカリ性を問わず使用することができる。分解は6時間行い、分解中の温度は47℃、pHは6.8に調整する。pHの調整には炭酸カリウム水溶液を用いる。プロテアーゼによる分解が終了したら脱脂粉乳溶液を80℃に加温し、10分間保持することでプロテアーゼを失活させる。失活後に脱脂粉乳の質量濃度が10%となるように水でメスアップし、脱脂粉乳の1～10質量%、好適には3～7質量%のビール酵母エキスを添加した後、滅菌する。滅菌条件はオートクレーブを用いる場合が121℃で7分以上、滅菌プレートを用いる場合が140℃以上で4秒以上とする。こうして得られた培地中には通常4～5質量%の乳糖が含まれている。

【0010】

培養は、嫌氣的条件下で行われる。嫌氣的条件は、例えば窒素ガス、ヘリウムガス、アルゴンガス、水素ガス、その他不活性ガスを1種又は2種以上組み合わせることが可能で、中でも窒素ガス又は炭酸ガス雰囲気下の条件とするのが好ましい。より具体的には、ファーマンター中に窒素ガス、炭酸ガス等を上面通気で流し、攪拌を行い、培地温度を33℃に調整する。培地温度が33℃で安定したら、プロピオン酸菌スターターを接種して嫌氣的条件下培養を開始する。スターターには、プロピオン酸菌の賦活培養液や、培養液の菌体濃縮物などが利用可能である。培地への添加量は、前者の場合培地に対して0.05%、後者の場合0.3%程度が目安となるが、これらの量は必要に応じて適宜変更してもかまわない。

【0011】

培養温度は、20～40℃、培地のpHは中性～微酸性（好ましくはpH5.5～7.5）の条件下で培養する。培養中の酸度上昇を抑制するには、炭酸カリウム水溶液、炭酸ナトリウム水溶液等、中和剤として知られている公知のものを使用することができる。

【0012】

まず、培地中の乳酸濃度が3.5質量%以下になった時点で培地にエアレーションする方法について説明する。この手段によりDHNAの生産量が增大することは、驚くべきことである。エアレーションを継続的に行うことによりDHNAの生産量が增大する理由は明らかではないが、プロピオン酸菌が刺激されるためと考えられる。また、このエアレーションによって、プロピオン酸菌がプロピオン酸の消費を開始する。

【0013】

エアレーションを開始する時期は、培地中の乳糖濃度が3.5質量%以下になった時点であるが、1～3.5質量%、特に1.5～3質量%となった時点がより好ましい。乳糖濃度が3.5質量%以下になった時点でエアレーションすることでプロピオン酸菌は、乳糖に加えプロピオン酸も消費するようになり、最終的に乳糖はほぼ枯渇する。前述の培地及び培養条件では、培養開始後約48時間後に、乳糖濃度が3.5質量%以下になり、エアレーション開始時期となる。この時、プロピオン酸菌の菌数は、 1×10^9 cfu/mL (9.0 log cfu/mL) 以上、特に 1×10^{10} cfu/mL (10.0 log cfu/mL) 以上となっている。なお、乳糖、ブドウ糖といったプロピオン酸菌の炭素源となる糖類を途中添加する培養法も知られているが（例えば特許文献1、特開平10-304871号公報）、本発明においては、これら糖類を途中添加はせず、枯渇させることが好ましい。

【0014】

エアレーションによる空気の供給量としては、プロピオン酸菌に刺激を与える程度の量が好ましい。この条件に相当する一例としてラボスケール（1.5 L容量）での具体例を挙げると、スパージャーを使用し攪拌バネで150 rpmの条件下培養を行う場合、空気の供給量は2 L以上/分、より好ましくは2 L/分～4 L/分であるが、容量、攪拌速度、装置等に合わせ適宜調整することができる。なお、液中の溶存酸素量が必要以上に高くなった場合には、プロピオン酸菌の生育が休止し、DHNAの産生も止まる。前記の培地及び培養条件の場合、通常培養開始から約168時間で培養を終了する。

【0015】

エアレーションの方法としては、多孔性の通気チューブを挿入して、チューブ全面で空気を送り込む方法や、スパージャーで気泡を送り込む方法が挙げられる。

【0016】

このようにして、培地及び菌体に蓄積されたDHNAは、培養を停止し、直ちにその培養物よりDHNAの採取に供することができる。また、培養の終点としては、菌数が定常期を通過し、菌数に減少が見られ始めた時点が目安となる。

【0017】

次に、培養終了後の培養物に乳糖を添加し、弱アルカリ下で3～20℃に保存してDHNAを製造する方法について説明する。ここで培養物は、前記のエアレーション後の培養物でもよいが、エアレーションを経由しない通常の嫌氣的又は微好氣的条件下による培養終了後の培養物でもよい。

【0018】

培養物への乳糖添加量は、培養物中の乳糖濃度が0.2～3質量%、さらに0.4～2.5質量%、特に0.8～2.2質量%となるよう設定することが好ましい。また、弱アルカリ下にするには、炭酸カリウム、炭酸ナトリウム、リン酸ナトリウム等の塩基を添加して培養物のpHが7～9、特に7.5～8.5になるようにするのが好ましい。また、保存温度は3～20℃、特に3～15℃、さらに5～15℃が好ましい。保存期間は、1～3週間、特に1～2週間が好ましい。

【0019】

このような弱アルカリ下の低温保存により培養物中のDHNA含量が向上する。こうして、新たな設備を必要とせず、省スペースで、しかも保存中にDHNA量を増大できる本

方法は極めて有用かつ効果的な製造法といえる。

【0020】

次に、DHNAの採取方法について説明する。得られた培養物を吸着クロマトグラフィーに付すのが好ましい。吸着剤としては、活性炭や合成吸着剤（例えばダイアイオンHP-20、三菱化学（株）製）などの逆相系の吸着剤を広く使用することができる。まず、吸着剤をカラムに充填し、0.5%（w/v）アスコルビン酸ナトリウム水溶液で洗浄する。次いで、得られた培養物をカラムに添加し（通過液をpassとした）、さらに0.5%（w/v）アスコルビン酸ナトリウム水溶液で水溶性画分を除去する。その後、0.5%（w/v）量アスコルビン酸ナトリウムを添加したエタノールで溶出し、このエタノール溶出画分を濃縮することで、DHNAを高濃度に含む組成物を得ることができる。さらに、精製を行い、純粋なDHNA又はその塩を得ることができる。尚、カラムからのDHNAの溶出液としてエタノールの代わりにメタノールを用いてもよい。

【0021】

DHNAの塩としては、薬学的又は食品学的に許容できる塩が挙げられ、代表的な塩には、酢酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、重炭酸塩、乳酸塩、クエン酸塩などが含まれるが、これらは例示であって、本発明はこれらの塩に限定されない。

【0022】

DHNAは、DHNA産生菌の培養物中（菌体内及び／又は外）に含有されているので、吸着クロマトグラフィーを適用せずに培養物それ自体をロータリーエバポレーター等を使用し、濃縮することによってDHNAを高濃度に含有する組成物を得ることができる。また、通常の遠心分離法によって培養物から菌体を分離し得られた上清を濃縮することも好ましい。こうして得られた組成物は、利用する形態にあわせ、液状のまま用いてもよいし、粉末状に加工することもできる。

【0023】

かくして得られたDHNA含有組成物はDHNA濃度が高く、苦みが抑制され、風味が良好である。従って、本発明のDHNA含有組成物、又はDHNAもしくはその塩は、飲食用又は医薬品いずれの形態でも利用することができ、例えば、医薬品として直接投与することにより、或いは特定保険用食品等の特別用途食品、栄養機能食品として直接摂取することにより、あるいはまた、各種食品（牛乳、清涼飲料、発酵乳、ヨーグルト、チーズ、パン、ビスケット、クラッカー、ピッツァクラストその他）に添加しておき、これを摂取することによって、腸内フローラの改善や牛乳の摂取時にみられる腹部不快症状の低減、代謝性骨疾患の予防治療することができる。

【0024】

前記食品を製造するために、主成分として、水やタンパク質、糖質、脂質、ビタミン及びミネラル類、有機酸、果汁、フレーバー類等を組み合わせることができる。例えば、全脂粉乳、脱脂粉乳、部分脱脂粉乳、カゼイン、ホエイ粉、ホエイタンパク質、ホエイタンパク質濃縮物、ホエイタンパク質分離物、 α -カゼイン、 β -カゼイン、 β -ラクトグロブリン、 α -ラクトアルブミン、ラクトフェリン、大豆タンパク質、鶏卵タンパク質、肉タンパク質等の動植物性タンパク質、これら加水分解物、バター、乳清ミネラル、クリーム、ホエイ、乳清ミネラル、非タンパク態窒素、シアル酸、リン脂質、乳糖等の各種乳由来成分；蔗糖、ブドウ糖、果糖、糖アルコール類、麦芽糖、オリゴ糖類、化工澱粉（デキストリンのほか、ソリュブルスターチ、プリティッシュスターチ、酸化澱粉、澱粉エステル、澱粉エーテル等）、食物繊維等の炭水化物；ラード、魚油などの動物性油脂；パーム油、サフラワー油、コーン油、ナタネ油、ヤシ油等の植物性油脂、これらの分別油、水添油、エステル交換油等の植物性油脂；ビタミンA、ビタミンB群、ビタミンC、ビタミンD群、ビタミンE、ビタミンK群、ビタミンP、ビタミンQ、ナイアシン、ニコチン酸、パントテン酸、ピオチン、イノシット、コリン、葉酸などの各種ビタミン；カルシウム、カリウム、マグネシウム、ナトリウム、塩素、銅、鉄、マンガン、亜鉛、セレン、フッ素、ケイ素、ヨウ素等のミネラル；リンゴ酸、クエン酸、乳酸、酒石酸等の有機酸や有機酸塩などがあげられ、これらから選択される1種又は2種以上を適宜選択して添加すること

ができる。これら各種成分は合成品の他、必要に応じこれらを多く含む食品で添加することも望ましい。

【0025】

本発明に係わる組成物、又はDHNAもしくはその塩を医薬品として使用する場合には、種々の形態で投与することができる。その形態として、例えば、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等による経口投与をあげることができる。これらの各種製剤は、常法に従って主剤に賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、矯味、矯臭剤、溶解補助剤、懸濁剤、コーティング剤などの医薬の製剤技術分野において通常使用しうる既知の補助剤を用いて製剤化することができる。

【実施例】

【0026】

以下、試験例、実施例を挙げ本発明を説明するが、本発明はこれにより限定されるものではない。なお、以下の試験例及び実施例においてDHNAの定量はWO03/016544第9頁に記載の方法に従って行った。乳糖濃度の測定は、乳糖電極を用いたフローインジェクション分析法（王子計測機器（株）製、フローインジェクション分析装置、Bio Flow Analyzer（商品名）使用）によって行った。プロピオン酸菌数の測定は、BL寒天培地で行った。プロピオン酸、酢酸濃度は、HPLC法（カラム：RS pak KC-811+プレカラムKC-G、検出：UV445nm）で測定した。

【0027】

【試験例1】エアレーション切替え時期の検討

（1）培地の調製

脱脂粉乳（明治乳業（株）製）150gを水1000gに溶解し、温度を47℃に調整した。これにプロテアーゼを3.75g添加して47℃で6時間タンパク質の分解を行った。タンパク質分解中のpHは6.6～6.8に炭酸カリウム溶液を用いて調整した。タンパク質分解後、80℃まで加温し10分保持することでプロテアーゼを失活させ、ビール酵母エキスを7.5g添加し、炭酸カリウム水溶液を用いてpHを6.95に調整した。水で溶液の容量を1500gに調整し、2L容量のファーマンターに入れ、培地滅菌を行った。滅菌条件は121℃、7分とした。

【0028】

（2）培養条件

ファーマンター中に窒素ガスを通気し、培地温度を33℃で安定させて、凍結濃縮スターター（P.freudenreichii ET-3）を0.75mL添加し、培養を開始した。発酵中の温度は33℃、pHは6.5に調整し、窒素ガスを通気した。pHの調整は40%（wt/wt）の炭酸カリウム水溶液を使用した。培養方法としては、以下の5種類を実施した。

【0029】

- 1) 培養開始から終了まで窒素ガス通気を継続、
 - 2) 培養開始から72時間後、96時間後に培養液の2%重量の乳糖を添加する以外は1)と同様、
 - 3) 培養開始から24時間後に窒素ガス通気をエアレーション（2L/分）に切替え、
 - 4) 培養開始から48時間後にエアレーション（2L/分）に切替え、
 - 5) 培養開始から72時間後にエアレーション（2L/分）に切替え、
- これらはすべて培養開始168時間後に培養を終了した。

【0030】

（3）結果

DHNA濃度、乳糖濃度、プロピオン酸菌数、プロピオン酸濃度、酢酸濃度の経時変化をそれぞれ図1、図2、図3、図4、図5に示す。この結果から明らかなように、4)、5)により得られた培養物は、DHNAの濃度が約45μg/mLとなった（図1）。また、4)、5)において、96時間後に乳糖がほぼ枯渇し（図2）、培養開始から増加していたプロピオン酸濃度も緩やかに減少することが確認された（図4）。プロピオン酸菌数は、3)を除き、培養終了時にはすべて 1.0×10^{10} cfu/mL (10.0 log cfu/mL)を越

え、4)、5)は、ほぼ 1.0×10^{11} cfu/mL (11.0 log cfu/mL) に達していた(図3)。

以上より、培養開始から少なくとも48時間経過した後に窒素通気からエアレーションに切替えることで、DHNAが高濃度に含まれる培養物が得られることが確認された(図6)。また、切替え時の乳糖濃度は、4)が3.3質量%、5)が2.9質量%であった(図2)。

【0031】

[試験例2]エアレーション量の検討

エアレーション量を変更する以外は、試験例1の5)と同様の条件で、培養を行った。発酵開始から72時間後に0.5 L/分、1.0 L/分、2.0 L/分、4.0 L/分にエアレーションの流量を変更し培養を行った。その結果、流量を2.0 L/分以上とすることで、培養開始から144時間後にDHNA濃度が約 $40 \mu\text{g/mL}$ となることがわかった。

【0032】

[実施例1]

脱脂粉乳(明治乳業(株)製)180 gを水1000 gに溶解し、温度を47℃に調整した。これにプロテアーゼを3.75 g添加して47℃で3時間タンパク質の分解を行った。タンパク質分解中のpHは6.6~6.8に炭酸カリウム水溶液を用いて調整した。タンパク質分解後に80℃まで加温し10分保持することでプロテアーゼを失活させ、ビール酵母エキス7.5 g、乳糖15 gを添加し、炭酸カリウム水溶液を用いてpHを6.95に調整した。水で溶液の容量を1500 gに調整し、2 L容量のファーメンターに入れ、培地滅菌を行った(乳糖濃度質量約6.1%)。滅菌条件は121℃、7分とした。滅菌後、ファーメンター中に窒素ガスを通気し、培地温度を33℃で安定させて、凍結濃縮スターター(P.freudenreichii ET-3)を0.75 mL添加し、培養を開始した。培養中の温度は33℃、pHは6.5に調整し、窒素ガスを通気した。pHの調整には4.0% (w t/w t)の炭酸カリウム水溶液を使用した。培養開始72時間後に窒素ガスの通気からエアレーションに切替え、培養開始168時間後に培養を終了した。エアレーション時の空気流量は、2 L/分、攪拌速度は、150 rpmとした。この結果、DHNAの濃度が $52 \mu\text{g/mL}$ となる培養物が得られた。72時間後の乳糖濃度は約1.9質量%であった。

【0033】

[実施例2]

脱脂粉乳(明治乳業(株)製)120 kgを水750 kgに溶解し、温度を47℃に調整した。これにプロテアーゼを2.5 kg添加し、pHを7.6に調整し47℃で3時間タンパク質の分解を行った。分解終了後に80℃まで加温し10分保持することでプロテアーゼを失活させ、ビール酵母エキス5 kg、乳糖10 kgを添加し、140℃、4秒で培地滅菌した。滅菌開始前の培地pHは6.9であった。滅菌後、水で培地量を1000 kgに合わせ(乳糖濃度約6.1質量%)、ファーメンター中に窒素ガスを20 L/分で通気し、培地温度を33℃で安定させて、スターター(P.freudenreichii ET-3)を3.0 L添加した。発酵中の温度は33℃、pHは6.5に調整し、窒素ガスを通気した。pHの調整は2.3% (w t/w t)の炭酸カリウム水溶液を使用した。培養開始72時間後に窒素ガスの通気からエアレーションに切替えて、培養開始168時間後に培養を終了した。エアレーション時の空気流量は200 L/分、攪拌速度は52 rpmとした。この結果、DHNAの濃度が $42 \mu\text{g/mL}$ となる培養物が得られた。なお、培養開始72時間後の乳糖濃度は約1.5質量%であった。

【0034】

[実施例3]

前記実施例2で得られたDHNA含有培養物に、アスコルビン酸ナトリウムを1.0%、乳糖を2.0%添加して、pHを8.0に調整してから、10℃で2週間保存した結果、DHNA濃度が $55 \mu\text{g/mL}$ となった。

【0035】

[比較例]

培養中、エアレーションに切り替えず、窒素ガス通気を継続する以外は、実施例1とすべて同様の条件で行った。この結果、DHNAの濃度が $32\mu\text{g/mL}$ となる培養物が得られた。

【0036】

[実施例4]

前記実施例1で得られたDHNA含有培養物を120gのプレーンヨーグルト（明治乳業（株）製）に加え、調製したヨーグルトの官能評価を表1及び表2に示す。本発明法により得られたDHNA含有培養物を加えたヨーグルトは、DHNA濃度が高く、従来法（プレーンヨーグルトに比較例で得られたDHNA含有培養物を添加したもの）と比較し、酸味がなく、苦みも感じられないことが確認された。

【0037】

【表1】

項目	風味	酸味	苦味	総合評価
実施例1で調製した培養物	○	○	-	◎
比較例で調製した培養物	○	○	×	△

×:不良 △:やや不良 ○:普通 ◎優良 -:感じない

プレーンヨーグルトに1g添加

プレーンヨーグルト:120g

【0038】

【表2】

項目	風味	酸味	苦味	総合評価
実施例1で調製した培養物	△	○	-	○
比較例で調製した培養物	△	△	×	×

×:不良 △:やや不良 ○:普通 ◎優良 -:感じない

プレーンヨーグルトに2g添加

プレーンヨーグルト:120g

【0039】

[実施例5]

脱脂粉乳（明治乳業（株）製）120kgを水750kgに溶解し、温度を47℃に調整した。これにプロテアーゼを2.5kg添加し、pHを7.6に調整し47℃で6時間タンパク質の分解を行った。分解終了後に80℃まで加温し10分保持することでプロテアーゼを失活させ、ビール酵母エキス5kg、乳糖10kgを添加し、140℃、4秒で培地滅菌した。滅菌開始前の培地pHは6.9であった。滅菌後、水で培地量を1000kgに合わせ（乳糖濃度約6.1質量%）、ファーメンター中に窒素ガスを20L/分で通気し、培地温度を33℃で安定させて、スターター（P. freudenreichii ET-3）を3.0L添加した。培養中の温度は33℃、pHは6.5に調整し、窒素ガスを通気した。pHの調整は23%（w t/w t）の炭酸カリウム水溶液を使用した。培養開始72時間後に窒素ガスの通気からエアレーションに切替えて、培養開始168時間後に培養を終了した。エアレーション時

の空気流量は200 L/分、攪拌速度は52 rpmとした。この結果、DHNAの濃度が48 $\mu\text{g/mL}$ となる培養物が得られた。なお、培養開始72時間後の乳糖濃度は約3.0 質量%であった。

【0040】

[実施例6]

前記実施例5で得られたDHNA含有培養物に、アスコルビン酸ナトリウムを1.0%、乳糖を1.0%添加して、pHを8.0に調整してから、10℃で2週間保存した結果、DHNA濃度が60 $\mu\text{g/mL}$ となった。

【図面の簡単な説明】

【0041】

【図1】エアレーションへの切替え時期を変化させた場合のDHNA濃度の変化を示す。

【図2】エアレーションへの切替え時期を変化させた場合の乳糖濃度の変化を示す。

【図3】エアレーションへの切替え時期とプロピオン酸菌数の変化を示す。

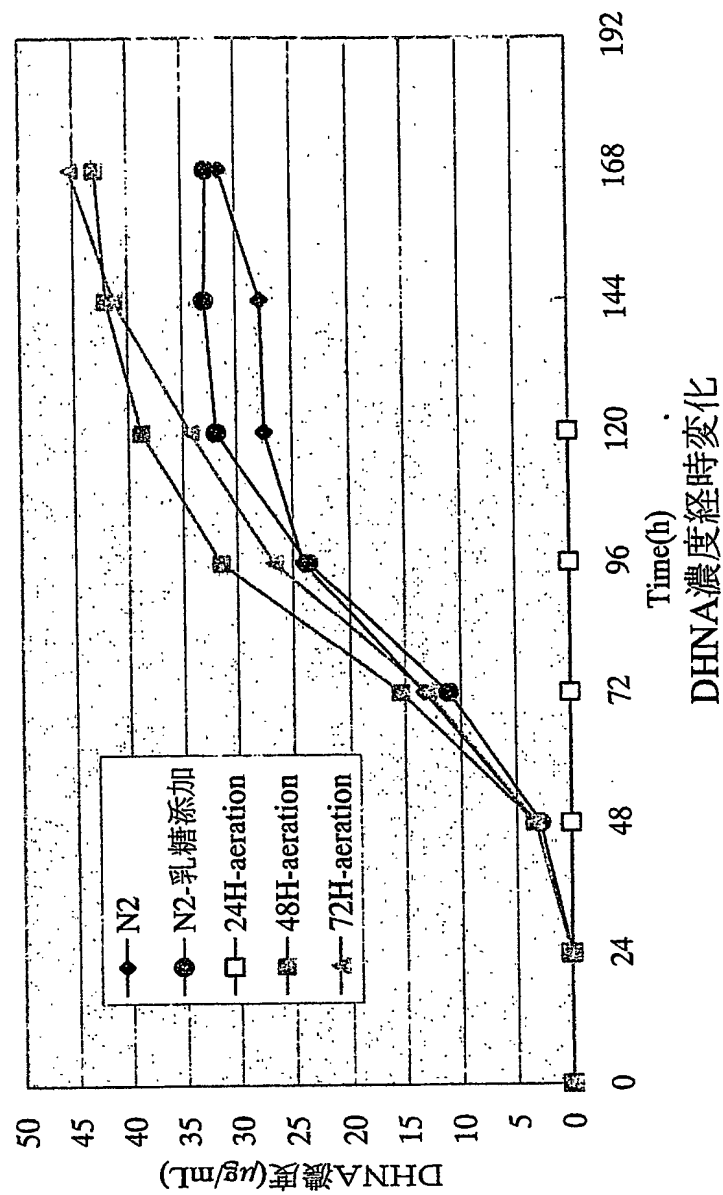
【図4】エアレーションへの切替え時期を変化させた場合のプロピオン酸濃度を示す。

。

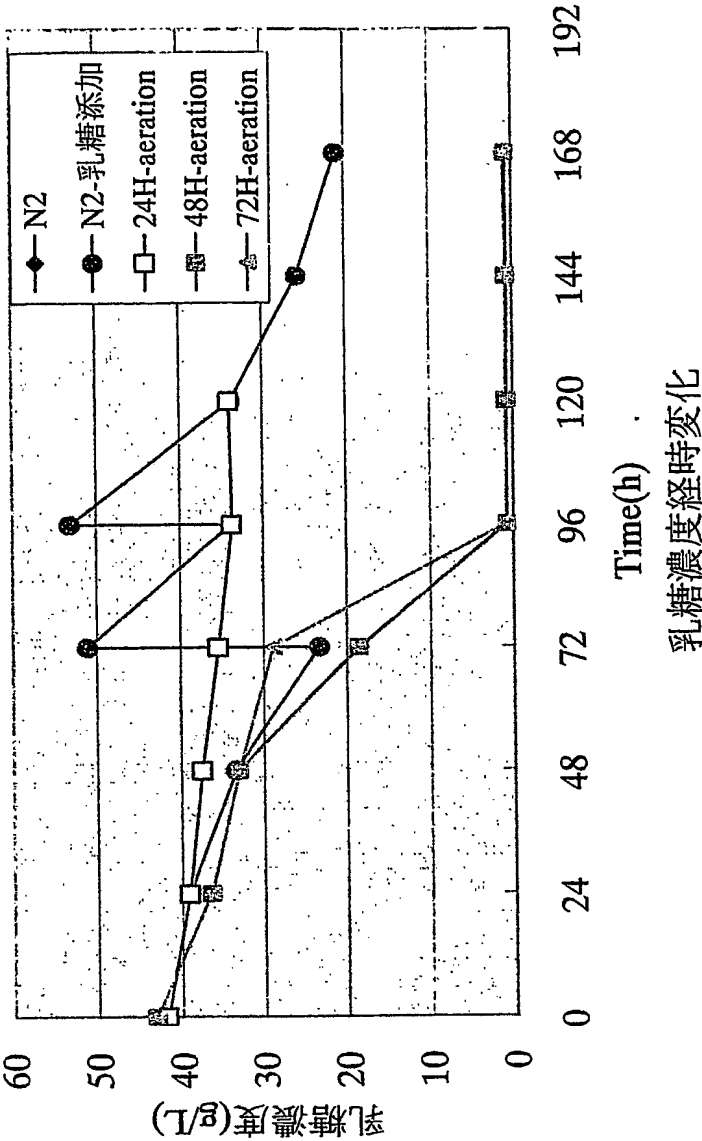
【図5】エアレーションへの切替え時期を変化させた場合の酢酸濃度を示す。

【図6】エアレーションの流量を変化させた場合のDHNA濃度を示す。

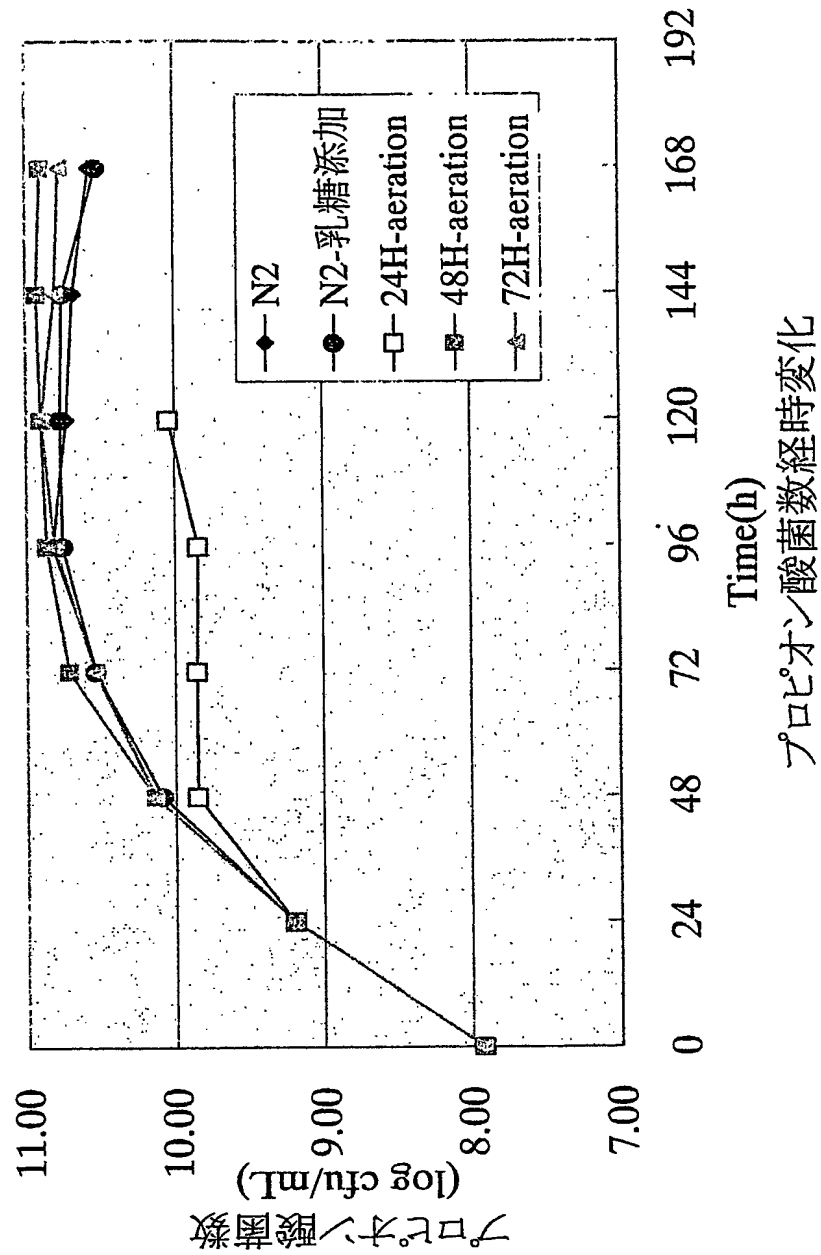
【書類名】 図面
【図1】



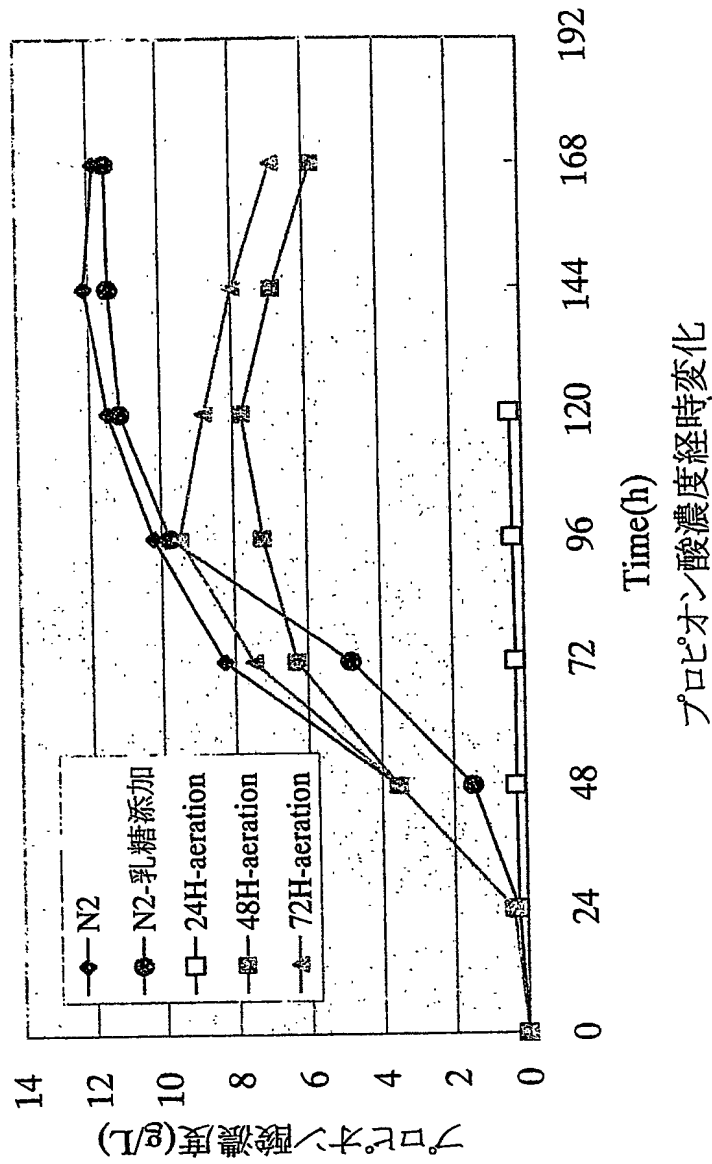
【図 2】



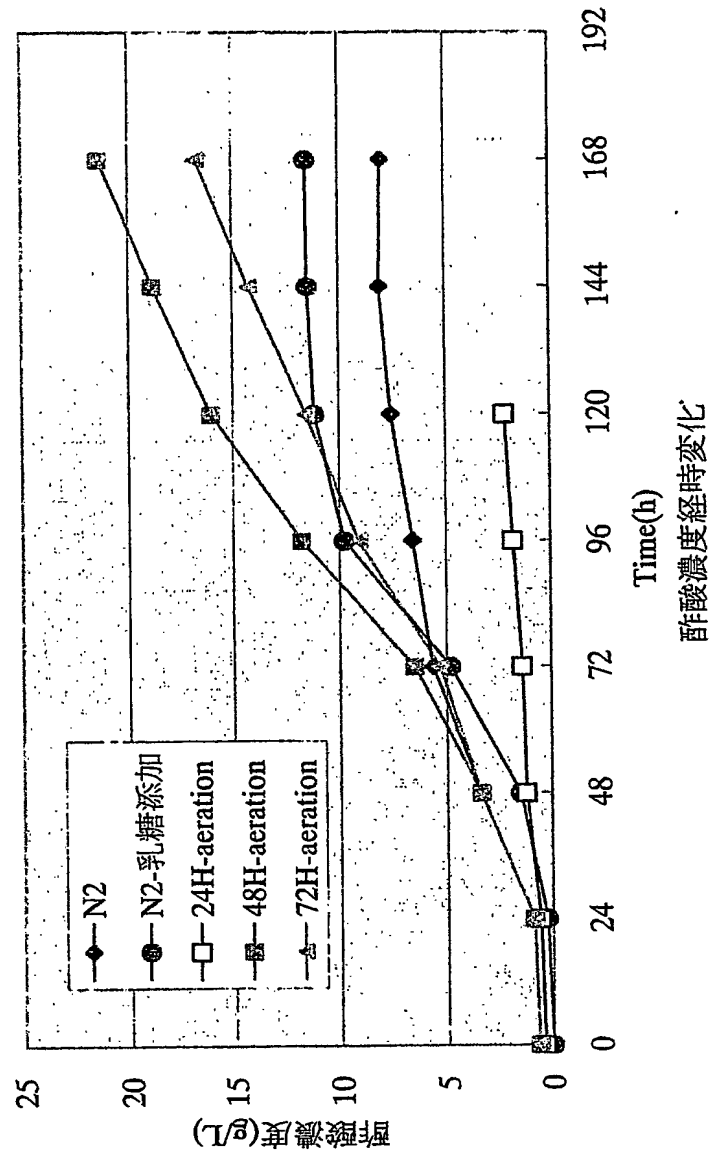
【図 3】



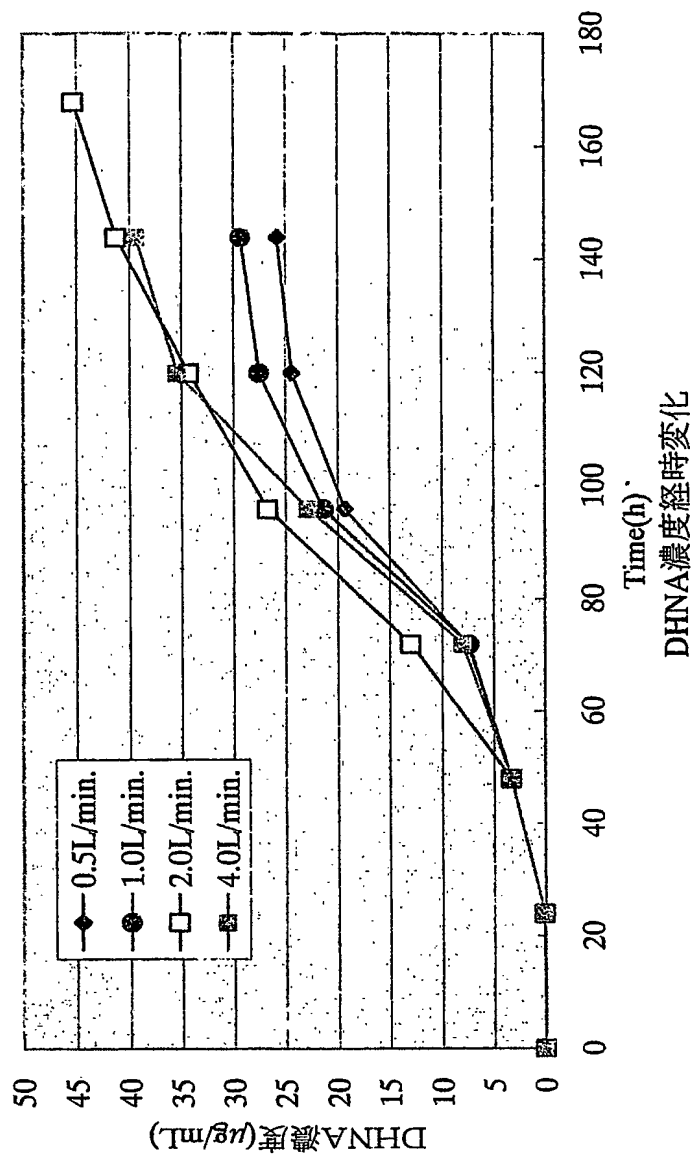
【図 4】



【図5】



【図 6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 プロピオン酸菌発酵を用いたDHNAの高濃度製法の提供。

【解決手段】 プロピオン酸菌に属する1, 4-ジヒドロキシー-2-ナフトエ酸生産菌を乳糖含有培地中嫌氣的条件下で培養を開始し、培地中の乳糖濃度が3. 5質量%以下になった時点で培地にエアレーションして培養することを特徴とする1, 4-ジヒドロキシー-2-ナフトエ酸の製造法。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 3 4 3 2 1 1
受付番号	5 0 3 0 1 6 3 1 0 6 8
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0 0 9 0
作成日	平成 1 5 年 1 0 月 2 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】	平成 15 年 10 月 1 日
-------	------------------

特願 2 0 0 3 - 3 4 3 2 1 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 6 1 3 8]

1. 変更年月日

2 0 0 1 年 1 0 月 2 日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都江東区新砂 1 丁目 2 番 1 0 号

氏 名

明治乳業株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☒ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.